

## NUTRICIÓN DE PLANTAS DE *Dendranthema grandiflora* OBTENIDAS *in vitro* DURANTE SU ACLIMATACIÓN EN INVERNADERO

### NUTRITION OF *Dendranthema grandiflora* PLANTS OBTAINED *in vitro* DURING THEIR ACCLIMATION TO GREENHOUSE

José Raymundo Enríquez del Valle\*, Beatriz Velásquez Toro, Alejandra Rosalba Vallejo Fuentes y Vicente Arturo Velasco Velasco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico Agropecuario No. 23. Apdo. Postal No.. 273. C.P. 68000 Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca. Tel y Fax: 01 (951) 517-0788. Correo electrónico: rayenriquez@mejico.com

\*Autor para correspondencia

#### RESUMEN

Plantas de crisantemo obtenidas *in vitro* a partir de ápices de tallo, se transfirieron a invernadero con radiación solar reducida a 50 % y humedad relativa alta, bajo una cubierta cerrada de polietileno transparente e iluminación incandescente de 100 W m<sup>-2</sup> por 4 h en las noches. Durante las cinco semanas de aclimatación se hicieron dos experimentos: en el primero las plantas se sometieron a 15 tratamientos consistentes de cinco mezclas de sustratos (100: 0, 75: 25, 50: 50, 25: 75 y 0: 100 de perlita y tierra de monte) y tres formas de fertilización (sin fertilizar; fertilizante con 22.5 g N- 3.35 g P y 31.3 g K por m<sup>3</sup> de sustrato; y fertiriego con 360 mg L<sup>-1</sup> N, 12 mg L<sup>-1</sup> P y 520 mg L<sup>-1</sup> K). La adaptación de las plantas fue de 95 % y el mayor crecimiento se logró en el sustrato con mayor contenido de materia orgánica, al alcanzar 10.5 cm de altura, 1.9 mm de diámetro de tallo, 26 hojas y 620 mg de biomasa. En el segundo experimento las plantas se establecieron en macetas con una mezcla de arena-vermiculita, y se fertigaron diariamente con seis niveles (1, 25, 50, 75, 100 y 125 %) de la solución universal de Steiner. Todas las plantas se adaptaron; las que recibieron la solución nutritiva a 125 %, con 171.6 mg L<sup>-1</sup> N, 38.3 mg L<sup>-1</sup> P, 393.9 mg L<sup>-1</sup> K, 175.8 mg L<sup>-1</sup> Ca, 26.8 mg L<sup>-1</sup> Mg y 93.1 mg L<sup>-1</sup> S, y las que recibieron la solución nutritiva a 1 %, tuvieron 5.3 y 4.1 cm de altura, 1.9 y 1.7 mm de diámetro de tallo, 18.9 y 9.4 hojas, 27 y 5.9 cm<sup>2</sup> de área foliar, 565 y 231 mg de biomasa, 2.4 y 1.7 % de N en las hojas, así como 1.45 y 1.15 mg de clorofila g<sup>-1</sup> de peso fresco foliar, respectivamente.

**Palabras clave:** *Dendranthema grandiflora*, aclimatación, fertilización, micropagación, sustratos.

#### SUMMARY

Chrysanthemum vitroplants obtained from shoot apices, were grown under greenhouse conditions covered with plastic polyethylene at 50 % of solar radiation and a high relative humidity, and incandescent lamps providing 100 W m<sup>-2</sup> during 4 h at night. During the five weeks of acclimatization two experiments were carried out: in the

first, plants were submitted to 15 treatments consisting of five substrate mixtures (100: 0, 75: 25, 50: 50, 25: 75 and 0: 100 of perlite and organic forest soil) and three forms of fertilizing (with no fertilizer; fertilizer with 22.5 g N, 3.35 g P and 31.3 g K per m<sup>3</sup> of substrate; and fertigation with 360 mg L<sup>-1</sup> N, 12 mg L<sup>-1</sup> P and 520 mg L<sup>-1</sup> K). Most plants (95 %) became adapted to greenhouse conditions, and the highest growth was obtained in the substrate with the greatest organic matter content, where plants reached 10.5 cm of height, 1.9 mm of stem diameter, 26 leaves and 620 mg of biomass. In the second experiment the plants were established in pots with a 1:1 mixture of sand and vermiculite, and fertigated daily with six levels (1, 25, 50, 75, 100 and 125 %) of the Steiner's universal solution. All the plants became adapted; those which received the solution at 125 %, with 171.6 mg L<sup>-1</sup> N, 38.3 mg L<sup>-1</sup> P, 393.9 mg L<sup>-1</sup> K, 175.8 mg L<sup>-1</sup> Ca, 26.8 mg L<sup>-1</sup> Mg and 93.1 S, and the plants that received the solution at 1 %, had 5.3 and 4.1 cm of height, 1.9 and 1.7 mm of stem diameter, 18.9 and 9.4 leaves, 27 and 5.9 cm<sup>2</sup> of leaf area, 565 and 231 mg of biomass, 2.4 and 1.7 % of N in leaves, and 1.45 and 1.15 mg of chlorophyll g<sup>-1</sup> of leaf fresh weight, respectively.

**Index words:** *Dendranthema grandiflora*, acclimation, fertilizing, micropagation, substrate.

#### INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) es una especie ornamental para maceta y flor cortada con alta demanda en el mercado, de la que mediante el mejoramiento genético han sido creadas numerosas variedades que difieren en el porte de la planta, así como en la forma y color de flor. Las plantas se propagan vegetativamente mediante esquejes homogéneos en consistencia y tamaño, que se extraen de plantas que se mantienen en desarrollo vegetativo. A los esquejes se les aplica en su extremo basal, una sustancia promotora del enraizado, antes de ser establecidos en sustratos ligeros con buen drenaje y aireación, en alta humedad relativa como la creada mediante aplicación de riegos por nebulización, temperaturas entre 15 a 27 °C que son apropiadas para el enraizado, e iluminación nocturna para evitar el desarrollo reproductivo (Horst, 1990).

Cuando los factores ambientales señalados se controlan adecuadamente, se logran altas eficiencias de propagación. Sin embargo, las condiciones ambientales en los invernaderos donde se cultivan las plantas madre y donde se hace el enraizado de los esquejes, también son propicios para la incidencia de patógenos. Durante los varios ciclos de propagación los patógenos pueden reducir la calidad sanitaria y vigor de las plantas, así como la calidad y valor comercial de las flores cosechadas. Una forma de evitar tales problemas fitosanitarios es la propagación de crisantemo mediante el cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos. Dicha forma de propagación es eficiente (Earle y Langhans, 1974 a, 1974 b; Kaul *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1990) para recuperar clones libres de patógenos específicos, y conveniente para producir plantas madre (Horst, 1990). Además, el cultivo de tejidos se usa como complemento a métodos biotecnológicos para producir variedades de

crisantemo genéticamente transformadas (Jong *et al.*, 1993; Rout y Das, 1997).

A pesar de la cantidad de trabajos de propagación *in vitro* de crisantemo, hay pocas referencias que mencionen el comportamiento de las plantas de esta especie durante la aclimatación en invernadero (Earle y Langhans, 1974 b; Wardle *et al.*, 1983). Cuando las plantas obtenidas *in vitro* se llevan al invernadero para su aclimatación, se les proporciona alta humedad relativa, sombra (50 %), sustratos ligeros, con buen drenaje y aireación, y temperatura ambiental de 17 a 25 °C, adecuada para el crecimiento. Si durante la aclimatación se proporcionan adecuados niveles de nutrición, las plantas muestran mayor capacidad de crecimiento y vigor, así como mejor desarrollo y rendimiento económico en la posterior plantación definitiva (Enríquez *et al.*, 2000).

El presente trabajo consistió de dos experimentos para evaluar tres formas de fertilización y dos sustratos, y la aplicación de fertiriego con seis concentraciones diferentes de nutrientes, en su efecto sobre el desarrollo vegetativo de plantas de crisantemo obtenidas *in vitro*, durante su aclimatación en invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los brotes de crisantemo cv. Polaris White se obtuvieron *in vitro* a partir de ápices meristemáticos de 0.5 mm establecidos en un medio que contenía las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina, 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético, y 5.4 g L<sup>-1</sup> de agar-agar. Para la multiplicación de propágulos, en subcultivos cada siete semanas, los brotes se cortaron en fragmentos de 0.5 cm que contenían yemas axilares para inducir la brotación y la formación de raíces adventicias, en un medio de cultivo de composición similar sin fitohormonas. Los brotes se incubaron bajo luz fluorescente blanca a 2000 lux de intensidad, con fotoperíodo de 16/8 h de luz y oscuridad, y 22 a 29 °C.

De las plantas obtenidas se seleccionaron 270 de 4.5 a 5 cm de altura, de las cuales se tomó una muestra de 12 plantas para cuantificar altura, diámetro de tallo, materia seca total, número de hojas y área foliar, al inicio de su aclimatación. Las 258 plantas restantes se sacaron del medio de cultivo y se les podó la raíz a 1 cm de longitud, luego se sumergieron durante 5 min en una solución 0.1 % de fungicida CIS (N-((triclorometil) tio) 4-ciclohexen- 1, 2 dicarboximida), equivalente a 50 % de i. a.; posteriormente en la base del tallo se les aplicó un producto comercial promotor del enraizado de estacas, con los ingredientes activos alfalfaftilacetamida (1.2 g de i. a. kg<sup>-1</sup>) y ácido in-

dol-3-butírico (0.6 g de i. a. kg<sup>-1</sup>). Las plantas se colocaron individualmente en macetas de 130 cm<sup>3</sup> que contenían los diversos sustratos a evaluar, se llevaron al invernadero y se colocaron en bancas de concreto de 90 cm de altura, 1.2 m de ancho y 12 m de longitud. Una malla sombra se colocó a 1.2 m sobre estas plantas, para disminuir en 50 % la radiación solar. Con la finalidad de mantener alta humedad relativa alrededor de las plantas, una vez al día se les aplicó agua mediante aspersión foliar, y durante las primeras cuatro semanas de aclimatación se colocaron bajo una cubierta cerrada de polietileno transparente, que posteriormente se eliminó. Para evitar que las plantas desarollaran flores, de las 22:00 a las 02:00 h se encendieron dos lámparas incandescentes de 100 W, separadas 1 m entre sí y colocadas dentro de la estructura de sombra, a 80 cm sobre las plantas.

Durante la etapa de aclimatación de plantas se realizaron dos experimentos.

**Experimento 1:** Evaluación de plantas en sustratos con proporciones diferentes de tierra de monte y que recibieron formas diferentes de fertilización. Las 210 plantas se dividieron en 15 grupos, y se sometieron a igual número de tratamientos durante las cinco semanas de aclimatación. Los 15 tratamientos resultaron de combinar dos factores: 1) Tipo de sustrato en cinco niveles, que consistieron en mezclas de perlita con tierra de monte, en varias proporciones (100: 0, 75: 25, 50: 50, 25: 75 y 0: 100); 2) Fertilización inorgánica, en tres niveles: A) Sin aplicación de fertilizante; B) con incorporación de fertilizante que contenía 22.5 g N, 3.35 g P y 31.3 g K por m<sup>3</sup> de sustrato, que correspondió a un décimo de la dosis total recomendada por Vidalie (1992) en el cultivo de crisantemo para producción de flor; C) Aplicación de fertilizante disuelto en el riego, a razón de 360 mg L<sup>-1</sup> de N, 12 mg L<sup>-1</sup> de P y 520 mg L<sup>-1</sup> de K, de acuerdo con Vidalie (1992) (Cuadro 1). El análisis físico y químico de la tierra de monte se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Tratamientos de sustratos y fertilización usados para la adaptación en vivero de plantas de crisantemo obtenidas *in vitro*.

Fertilización	Mezcla de perlita: tierra de monte				
	100:0	75:25	50:50	27:75	0:100
A	1	4	7	10	13
B	2	5	8	11	14
C	3	6	9	12	15

A = Sin fertilización; B = Fertilizante 22.4 g N-3.35 g P-31.3 g K m<sup>-3</sup> de sustrato; C = Fertiriego con 360 mg L<sup>-1</sup> de N, 12 mg L<sup>-1</sup> P y 520 mg L<sup>-1</sup> K.

El experimento se estableció en un arreglo factorial 5 x 3 enmarcado en el diseño completamente aleatorio con 14 repeticiones y la unidad experimental fue una planta. A los 35 d en todas las plantas se cuantificó la altura y diámetro de tallo, así como el número de hojas. En cinco

plantas tomadas al azar de cada tratamiento, la raíz y parte aérea se separaron y colocaron en bolsas de papel, para secarlas en estufa a 70 °C durante 24 h y luego pesarlas en balanza analítica para cuantificar la materia seca acumulada en cada parte. Los datos obtenidos se sometieron al análisis de varianza correspondiente, y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey.

*Cuadro 2. Características físicas y químicas de la tierra de monte utilizada para la adaptación en vivero de plantas de crisantemo obtenidas in vitro.*

Determinación	Valor	Clasificación	Método
Materia orgánica (%)	19.7	Extremadamente rico (Moreno, 1978)	Whalkley y Back (León y Aguilar, 1987)
Nitrógeno total (%)	0.7	Extremadamente rico (Moreno, 1978)	Semimicro-Kjedahl (Etchevers, 1987)
Fósforo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	5.0	Bajo (CSTPA, 1980)	Bay-1 (Cajuste, 1987)
pH	5.2	Fuertemente ácido (Moreno, 1978)	Relación aguasuelo 2:1 (Goiberg y Aguilar, 1987)
Textura		Migajón arenoso	Triángulo de textura de Bouyoucos (Honorato, 1997)
Arena (%)	64.5		
Limo (%)	21.0		
Arcilla (%)	14.5		

**Experimento 2:** Prueba de diferentes concentraciones de nutrientes, con fertigación. Se establecieron 48 plantas en un sustrato inerte compuesto de una mezcla de arena y vermiculita a 50:50. El tamaño de maceta, las condiciones ambientales y el periodo de aclimatación fueron similares que en el experimento anterior. Se formaron seis grupos de plantas, que se fertirrigaron con diferentes soluciones nutritivas, correspondientes a las alícuotas de 1, 25, 50, 75, 100 y 125 % de los macro y micronutrientos de la solución universal de Steiner (1984). La concentración de macronutrientos (en  $\text{mg L}^{-1}$ ) de la solución sin diluir fue: 137.28 N, 30.675 P, 315.15 K, 140.62 Ca, 21.45 Mg y 74.51 S. Durante las cinco semanas de aclimatación se aplicaron diariamente a cada planta 25 mL de solución nutritiva, y al término de este tiempo se cosecharon para

cuantificar su altura, diámetro de tallo, número de hojas, área foliar, materia seca total, contenido de nitrógeno (%) y contenido de clorofila ( $\text{mg g}^{-1}$  de peso fresco) en las hojas. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar, donde la unidad experimental fue una planta y con ocho repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron a análisis de varianza y a la comparación de medias mediante la prueba de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se tienen referencias acerca del comportamiento de plantas de crisantemo generadas *in vitro* cuando se establecen para su aclimatación en sustrato y condiciones de invernadero. En el presente trabajo las plantas de crisantemo obtenidas *in vitro* tenían en promedio 4.8 cm de altura, 1.2 mm de diámetro de tallo, 1.4  $\text{cm}^3$  de volumen de raíz, 8 hojas, 5.6  $\text{cm}^2$  de área foliar y 74.5 mg de materia seca acumulada total. Más del 95 % de las plantas que se transfirieron a macetas se adaptaron al ambiente externo en que se usó sombra parcial, humedad relativa alta y sustratos esterilizados con buen drenaje y aireación, pero la magnitud de crecimiento al término de la aclimatación varió con el nivel de abastecimiento de nutrientes, como se describe a continuación.

### Experimento 1

Cinco semanas después de transferir las plantas al invernadero, en 14 tratamientos la mayoría de las plantas se adaptaron, pero no en las establecidas en la mezcla con 75 % de perlita y 25 % de tierra de monte en donde sólo se adaptó el 35.7 %. El factor sustrato tuvo efectos altamente significativos ( $P \leq 0.01$ ) en la altura de planta, diámetro de tallo, la materia seca acumulada en la raíz y en la parte aérea, y tuvo efectos significativos ( $P \leq 0.05$ ) en el número de hojas (Cuadro 3). El factor fertilización tuvo efecto significativo ( $P \leq 0.01$ ) en la altura de planta y diámetro de tallo, pero no tuvo efecto en el número de hojas, la materia

*Cuadro 3. Resumen de análisis de varianza de las características de plantas de Dendranthema grandiflora obtenidas in vitro que durante su aclimatación se sometieron a sustratos y formas de fertilización diferentes.*

Fuentes de variación	GL	Cuadrados medios					
		Altura	No. de hojas	Diámetro del tallo	Materia seca en raíz	Materia seca aérea	
Tratamientos	14	39.0 **	206.0 **	0.0021 **	0.009 **	0.057 **	
Sustratos	4	65.6 **	217.0 *	0.0050 **	0.028 **	0.125 **	
Fertilización	2	51.1 **	91.7 ns	0.0050 **	0.001 ns	0.014 ns	
Sust. * Fert.	8	22.7 **	229.2 **	0 **	0.002 ns	0.033 **	
Error	186	3.9	69.8	0.0009			
	60 <sup>+</sup>				0.002 ns	0.007	
Total	200						
	74 <sup>+</sup>						

\* =  $P \leq 0.05$ , \*\* =  $P \leq 0.01$ ; <sup>+</sup>grados de libertad para el análisis de varianza de la materia seca en raíz y parte aérea.

seca acumulada en la raíz y parte aérea. La interacción entre el tipo de sustrato y la forma de fertilización, tuvo efectos significativos ( $P \leq 0.01$ ) en la altura de planta, diámetro de tallo, número de hojas y materia seca acumulada en la parte aérea.

Después de cinco semanas en invernadero, las plantas establecidas en el sustrato compuesto de perlita a 100% y que no fueron fertilizadas (tratamiento 1), apenas crecieron 19 % en relación a su altura inicial de 4.8 cm, mientras que las establecidas en la mezcla de perlita y tierra de monte 50:50, y que se les aplicó fertilizante sólido (tratamiento 8), crecieron 137 %. Las plantas crecieron más en los sustratos con alta proporción de tierra de monte, pero las más altas se lograron en el sustrato con 50 % de perlita, a las que se proporcionó fertilizante ya sea sólido (Tratamiento 8) o en el riego (Tratamiento 9). Lo anterior puede indicar que las características físicas que la perlita posee (baja densidad y 96 % de su volumen corresponde a macroporos; (Lemaire, 1995), confiere al sustrato características importantes para el desarrollo y desempeño de la raíz, y que la escasez de materia orgánica puede ser compensada con la aplicación de fertilizantes minerales. En el caso de las plantas que crecieron en perlita sola, éstas tuvieron alturas similares estadísticamente a las establecidas en los mejores tratamientos, cuando se les aplicó fertilizante disuelto en el agua de riego.

Las plantas que crecieron en la mezcla con 75 % de perlita (Tratamiento 4), tuvieron 5.6 hojas en promedio, cantidad que fue menor ( $P \leq 0.05$ ) a las que formaron las plantas en los demás tratamientos, que tuvieron de 18 a 27 hojas (Cuadro 4). Los contrastes en la cantidad de hojas se asociaron con las diferencias en materia seca acumulada en la parte aérea de las plantas. En ausencia de fertilización (Tratamientos 1, 4, 7, 10 y 13) las plantas mostraron mayor acumulación de materia seca en la raíz, parte aérea y total, conforme el sustrato contenía mayor proporción de tierra de monte. La aplicación de fertilizante tuvo efecto adicional en la acumulación de materia seca solamente en los sustratos compuestos de perlita a 100% (tratamientos 2 y 3) o con 50 a 75 % de perlita (tratamientos 5, 6, 8 y 9). Las plantas establecidas en sustratos con 75 % o más de tierra de monte no mostraron ganancia en crecimiento al proporcionarles fertilización mineral (Cuadro 4).

En las plantas que crecieron en perlita sola y no fueron fertilizadas (Tratamiento 1), la materia seca asignada a la raíz representó 33 % del total de materia seca acumulada, en contraste con las plantas que crecieron en tierra de monte sin perlita y que no recibieron fertilizante (Tratamiento 13), que acumularon 17, 22 y 20.6 veces más materia seca en la raíz, parte aérea y total, respectivamente;

en estas últimas, la materia seca de la raíz representó 27 % del total acumulado por la planta, lo que puede indicar que con mayor disponibilidad de nutrientes la planta asigna más biomasa a la parte aérea que a la raíz.

Según Noordwijk y Willigen (1987), las dimensiones de cada uno de estos órganos puede ser explicado por la efectividad con la cual el órgano complementario abastece sus necesidades básicas del ambiente. En este concepto de equilibrio funcional se considera que los pequeños sistemas radicales pueden ser suficientes para lograr el máximo crecimiento vegetal, cuando el abastecimiento de agua y nutrientes es óptima.

Es decir, las plantas acumularon más materia seca conforme se aumentaba la proporción de tierra de monte en el sustrato, independientemente de la aplicación del fertilizante. Este comportamiento que se atribuye al suelo orgánico permitió cubrir la demanda nutrimental de las plantas y hace innecesario aplicar nutrientes vía fertilización. El sustrato de 100 % tierra de monte (Tratamiento 13) la aplicación de fertilizante no condujo a lograr un crecimiento adicional.

Al transferir plantas de crisantemo obtenidas *in vitro* a maceta, Wardle *et al.* (1983) observaron escaso crecimiento y abscisión de las hojas inferiores. Torres (1989) también concluye que las plantas de diversas especies obtenidas *in vitro* comúnmente muestran crecimiento reducido al ser transferidas a la etapa de aclimatación. Sin embargo, en el presente trabajo las plantas de crisantemo obtenidas *in vitro* mostraron crecimiento activo durante su aclimatación en invernadero, cuando se les proporcionaron nutrientes. Estos resultados coinciden con Enríquez *et al.* (2000), quienes encontraron que plantas de *Lycopersicon esculentum* obtenidas *in vitro* a las que se abasteció con soluciones nutritivas durante 25 d en invernadero, acumularon 55 % más materia seca que las plantas no fertilizadas.

Las plantas obtenidas *in vitro* crecieron más y alcanzaron mejor vigor, cuando tuvieron más disponibilidad de nutrientes durante los 35 d de aclimatación en condiciones de invernadero. Las plantas adaptadas procedentes de los diversos tratamientos se establecieron en suelo e invernadero para ser cultivadas como plantas madre, a una densidad de 81 plantas/m<sup>2</sup>. Una vez que estas plantas se establecieron en suelo, se les proporcionó una iluminación de 100 W m<sup>-2</sup>, durante 4 h en la noche, para mantenerlas en condición vegetativa. Una semana después del trasplante, se les eliminó el ápice para inducir el desarrollo de brotes

Cuadro 4. Características de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* que durante cinco semanas de su aclimatación en invernadero estuvieron sometidas a sustratos y formas de fertilización diferentes.

Tratamiento	Mezcla	Fert.	Altura (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Número de hojas	Materia seca acumulada (mg)		
						Raíz	Parte aérea	Total
100: 0	A	5.7 e	1.6 ab	19.0 a	10 c	20 e	30 d	
100: 0	B	6.3 e	1.8 ab	19.4 a	90 abc	180 bcd	270 bcd	
100: 0	C	10.4 ab	1.9 ab	26.6 a	50 bc	110 de	160 cd	
75: 25	A	5.5 d	1.5 b	5.6 b	90 abc	120 de	210 bcd	
75: 25	B	8.3 bc	1.8 ab	22.6 a	80 abc	140 cde	220 bcd	
75: 25	C	9.1 ab	1.8 ab	19.8 a	80 abc	170 bcde	250 bcd	
50: 50	A	9.0 ab	1.9 ab	20.8 a	100 abc	130 de	230 bcd	
50: 50	B	11.4 a	2.0 a	21.5 a	100 abc	150 cde	250 bcd	
50: 50	C	10.9 ab	1.9 ab	21.7 a	90 abc	340 ab	430 ab	
25: 75	A	9.6 ab	1.8 ab	20.9 a	100 abc	170 bcde	270 bcd	
25: 75	B	10.2 ab	1.9 ab	18.2 a	90 abc	230 bcde	320 bc	
25: 75	C	10.0 ab	1.8 ab	24.6 a	130 ab	160 bcde	290 bcd	
0: 100	A	10.1 ab	1.9 ab	27.1 a	170 a	440 a	610 a	
0: 100	B	9.4 ab	1.9 ab	26.2 a	170 a	250 bcd	420 abc	
0: 100	C	10.0 ab	1.8 ab	22.8 a	150 a	320 abc	470 ab	
DMS			2.6	0.4	11.1	100	185	285

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa; A= Sin fertilizante; B= Fertilizante 22.5 g N- 3.35 g P, 31.3 g K por m<sup>3</sup> de sustrato; C= Fertirriego con 360 mg L<sup>-1</sup> N, 12 mg L<sup>-1</sup> P y 520 mg L<sup>-1</sup> K.

laterales; los brotes laterales se cortaron cuando alcanzaron 10 cm, para usarlos como esquejes en propagación vegetativa.

Los resultados preliminares mostraron que las plantas ya adaptadas provenientes de los diferentes tratamientos, continuaron mostrando diferencias en vigor. Las plantas que durante su adaptación estuvieron en condiciones de reducida disponibilidad de nutrientes, en promedio produjeron 2 esquejes después de 45 d de establecidas en suelo, mientras que las que durante su aclimatación crecieron con mayor disponibilidad de nutrientes produjeron 14 esquejes, en promedio. Aun cuando sea conveniente realizar un estudio más completo a las plantas obtenidas *in vitro* durante su desarrollo posterior a la etapa de aclimatación, los datos anteriores parecen indicar que el suministro oportuno y adecuado de nutrientes a las plantas obtenidas *in vitro* durante su aclimatación, es un aspecto determinante que influye en el desarrollo posterior y en el rendimiento económico.

## Experimento 2

Los resultados del análisis de varianza (Cuadro 5) muestran que la dosis de nutrientes en la solución nutritiva tuvo efectos significativos ( $P \leq 0.01$ ) en altura, número de hojas, área foliar, acumulación de materia seca total, y contenido foliar de nitrógeno, al término de la aclimatación de las plantas de crisantemo obtenidas *in vitro*. Las plantas que recibieron fertirriego con los nutrientes a 125 % tuvieron área foliar mayor ( $P \leq 0.05$ ) que las plantas que recibieron riego con los nutrientes a 1 %, 25 %, 50

% y 100 % de concentración de la formulación de Steiner (1984). Conforme las plantas se fertirrigaron con dosis crecientes de nutrientes, se observó la tendencia de que la concentración de clorofillas en las hojas aumentó. En los tratamientos de 1 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 % y 125 %, las plantas tenían 1.15, 1.32, 1.37, 1.37, 1.40 y 1.45 mg de clorofila/g de peso fresco foliar, cantidades que no fueron diferentes ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 6).

Las plantas con mayor área foliar y mayor concentración de clorofila fueron también las que acumularon más materia seca, probablemente debido a mayor capacidad para fijar CO<sub>2</sub> mediante la fotosíntesis. Según Jones (1983), la acumulación de materia seca, particularmente durante la fase de crecimiento vegetativo, es una función lineal de la cantidad de radiación solar interceptada, y los factores como nutrición y condición hídrica de la planta, tienen efecto en el rendimiento al alterar el índice de área foliar y la intercepción de luz.

Las plantas fertirrigadas con las soluciones a 50 %, 75 %, 100 % y 125 % de concentración de nutrientes, acumularon 3.7 %, 3.4 %, 3.3 % y 2.4 % de N en las hojas, respectivamente, y también fueron las de crecimiento más activo Benton *et al.* (1991) reportan que al inicio de desarrollo del botón floral del crisantemo, en la cuarta hoja a partir del ápice, la concentración de 4 a 6 % y más de 6 % de N son consideradas suficientes y altas, respectivamente. Pero en el trabajo citado el mayor contenido de N en las plantas podría ser debido a que las plantas ya no estaban en crecimiento activo.

Cuadro 5. Resumen de análisis de varianza en las características de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas in vitro y que durante 35 días de su aclimatación en invernadero se sometieron a fertiriego con concentraciones diferentes de nutrientos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Altura	No. de Hojas	Cuadrados medios	Diámetro de tallo	Biomasa	Nitrógeno en hojas	Clorofila en hojas
Tratamientos	5	3.91**	191.3**	448.4**	0.367 ns	0.096**	1.096**	0.043 ns
Error	42	0.85	17.3	9.3	0.154	0.006		
		18 <sup>+</sup>					0.016	0.018
Total	47							
		23 <sup>+</sup>						

\* = P ≤ 0.05, \*\* = P ≤ 0.01 ; <sup>+</sup> grados de libertad, para el análisis de varianza del contenido de nitrógeno y clorofila en las hojas.

Cuadro 6. Características de plantas de *Dendranthema grandiflora* que durante cinco semanas de su aclimatación en sustratos inertes y condiciones de invernadero se les aplicaron soluciones nutritivas con concentración diferente de nutrientos.

Trat.	Altura (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Número de hojas	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Biomasa (mg)	Nitrógeno en las hojas (%)	Contenido de clorofila en las hojas (mg g <sup>-1</sup> )
1 %	4.1 b	1.7 b	9.4 c	5.9 d	231 c	1.7 d	1.15 a
25 %	4.9 ab	1.5 cd	15.3 bc	13.7 c	369 b	2.9 bc	1.32 a
50 %	5.9 a	1.2 e	27.8 a	20.2 b	452 ab	3.7 a	1.35 a
75 %	4.3 b	1.6 c	18.8 b	22.8 ab	389 b	3.4 ab	1.37 a
100 %	4.6 ab	1.5 d	15.8 b	19.0 b	435 b	3.3 ab	1.40 a
125 %	5.3 ab	1.9 a	18.9 b	27.3 a	565 a	2.4 c	1.45 a
DMS	1.38	0.57	6.22	4.56	114	0.54	0.30

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa.

## CONCLUSIONES

Del total de plantas de *Dendranthema grandiflora* cv. Polaris White obtenidas *in vitro* y que crecieron durante cinco semanas en macetas con mezclas de sustratos, y en varias formas y dosis de fertilización, al menos 95 % de ellas se adaptaron bien a las condiciones de invernadero respectivamente.

Durante su aclimatación en invernadero las plantas mostraron crecimiento activo una vez trasplantadas y abastecidas de nutrientes. La aplicación de fertilizantes tuvo mayor efecto en el crecimiento cuando las plantas estuvieron en sustratos con nulo o bajo contenido (hasta 50 % del volumen) de tierra de monte. El mejor tratamiento consistió en el sustrato con 100 % tierra de monte y sin aplicación de fertilizante mineral, al producir plantas de 10.5 cm de altura, 1.9 mm de diámetro de tallo, 26 hojas y 620 mg de materia seca total.

En las plantas establecidas en el sustrato con 50 % de arena y 50 % vermiculita, el mejor tratamiento consistió en fertigar la solución nutritiva con 171.6 mg L<sup>-1</sup> N, 38.3 mg L<sup>-1</sup> P, 393.9 mg L<sup>-1</sup> K, 175.8 mg L<sup>-1</sup> Ca, 26.8 mg L<sup>-1</sup> Mg y 93.1 mg L<sup>-1</sup> S, pues al término de cinco semanas de aclimatación habían crecido a 5.3 cm de altura y 1.9 mm de diámetro de tallo, formado 18.9 hojas, con 27 cm<sup>2</sup> de área foliar, acumulado 565 mg de materia seca total, y sus hojas contenían 2.4 % de nitrógeno y 1.45 mg de clorofila/g de peso fresco.

## BIBLIOGRAFÍA

- Benton J J Jr, B Wolf, H A Mills (1991) Plant Analysis Handbook. Micro-Macro Publishing. Georgia. 213 p.
- Cajuste L J (1987) El fósforo aprovechable en los suelos. In: Análisis Químico para Evaluar la Fertilidad del Suelo. A Aguilar S, J D Etchevers B, J Z Castellanos R (eds). Soc. Mex. Ciencia del Suelo. Publicación Especial No. 1. pp:133-142.
- CSTPA. Council on Soil Testing and Plant Analysis (1980) Handbook on Reference Methods for Soil Testing. Athens, Georgia. 234 p.
- Earle E D, R W Langhans (1974 a) Propagation of chrysanthemum *in vitro*: I. Multiple plantlets from shoot tip and the establishment of tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99:128-132.
- Earle E D, R W Langhans (1974 b) Propagation of chrysanthemum *in vitro*: II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99: 352-358.
- Enríquez V J R, G Carrillo C, P Sánchez G, M N Rodríguez M, M C Mendoza C (2000) Fertilización para la óptima adaptación y vigor de vitroplantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rev. Fitotec. Mex. 23:59-68.
- Etchevers J D (1987) Determinación de nitrógeno en suelos. In: Análisis Químico para Evaluar la Fertilidad del Suelo. A Aguilar S, J D Etchevers B, J Z Castellanos R (eds). Soc. Mex. Ciencia del Suelo. Publicación especial No. 1. pp:45-83.
- Goijberg R G, A Aguilar S (1987) pH del suelo y necesidades de cal. In: Análisis Químico para Evaluar la Fertilidad del Suelo. A Aguilar S, J D Etchevers B, J Z Castellanos R (eds). Soc. Mex. Ciencia del Suelo. Publicación Especial No. 1. pp:17- 44.
- Honorato P R (1997) Manual de Edafología. 3a Ed. Ediciones Universitad Católica de Chile. 267 p.
- Horst R K (1990) Chrysanthemum. In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5, Ornamental Especies. P V Ammirato, D A Evans, W R Sharp, Y P S Bajaj (eds). McGraw-Hill Publishing Company. New York. pp:319-340.
- Jones H G (1983) Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology. Cambridge University Press, London. 323 p.
- Jong J, W Rademaker, M F van Wordragen (1993) Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants

- following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 32:263-270.
- Kaul V, R M Miller, J F Hutchinson, D Richards (1990)** Shoot regeneration from stem leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvalev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 21:21-30.
- Lemaire F (1995)** Physical, chemical and biological properties of growing medium. Acta Hort. 396: 273- 284.
- León R, A Aguilar (1987)** Materia orgánica. In: Análisis Químico para Evaluar la Fertilidad del Suelo. A Aguilar S, J D Etchevers B, J Z Castellanos R (eds). Soc. Mex. Ciencia del Suelo. Publicación Especial No. 1. pp:85-91.
- Lu Ch Y, G Nugent, T Wardley (1990)** Efficient direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Royal purple). Plant Cell Rep. 8:733-736.
- Moreno D R (1978)** Clasificación de pH del suelo, contenido de sales y nutrientes asimilables. INIA, SARH. México, D.F. 22 p.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Noordwijk M van, P D Willigen (1987)** Agricultural concepts of roots: from morphogenetic to functional equilibrium between root and shoot growth. Netherlands J. Agric. Sci. 35:487-496.
- Rout G R, P Das (1997)** Recent trends in the biotechnology of chrysanthemum: a critical review. Sci. Hort. 69:239-257.
- Steiner A A (1984)** The universal nutrient solution. In: Proc. Sixth International Congress on Soilless Culture. International Soc. Soilless Culture. The Netherlands. pp:633- 647.
- Torres K C (1989)** Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Van Nostrand Reinhold. New York. 285 p.
- Vidalie H (1992)** Producción de Flores y Plantas Ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 310 p.
- Wardle K, V Dalson, I Simpkins, K C Short (1983)** Redistribution of rubidium in plants of *Chrysanthemum morifolium* Ram. cv. Snowdon derived from tissue cultures and transferred to soil Ann. Bot. 51:261- 264.